

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 juillet 2001 (26.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/52887 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 39/245, A61P 31/22

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00189

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Date de dépôt international :
19 janvier 2001 (19.01.2001)

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/00797 21 janvier 2000 (21.01.2000) FR

(71) Déposant : MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat,
F-69002 Lyon (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeur: POULET, Hervé; 3, place des Quatre Vierges,
F-69110 Sainte Foy les Lyon (FR).

(74) Mandataire : JACOBSON, Claude; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(54) Title: VACCINATION AGAINST CANINE HERPESVIRUS INFECTION AND VACCINES

(54) Titre : VACCINATION CONTRE L'HERPESVIROSE CANINE ET VACCINS

WO 01/52887 A2

(57) Abstract: The invention concerns the use of a CHV antigen for preparing a vaccine against canine herpesvirus infection, to be administered to the pregnant bitch as close as possible to birth, preferably during the last third of pregnancy, and producing a high anti-CHV antibody rate in the pregnant bitch at the time of birth, inducing protection in the pups by antibody transfer during suckling. The invention also concerns an inactivated anti-CHV or subunit vaccine, useful for vaccinating pregnant females to protect pups by antibody transfer.

(57) Abrégé : Utilisation d'antigène de CHV pour la préparation d'un vaccin contre l'herpèsvirose canine, destiné à être administré chez la chienne gestante le plus près possible de la mise bas, de préférence pendant le dernier tiers de la gestation, et produisant un taux d'anticorps anti-CHV élevé chez la chienne gestante au moment de la mise bas, induisant une protection chez les chiots par transfert d'anticorps lors de l'allaitement. Vaccin anti-CHV inactivé ou de sous-unités, utilisable pour la vaccination des femelles gestantes pour protéger les chiots par transfert d'anticorps.

Vaccination contre l'herpèsvirose canine et vaccins.

La présente invention concerne la vaccination contre l'herpèsvirus canin.
5 Elle a notamment trait à une méthode de vaccination, à des vaccins appropriés et à l'utilisation de vaccins dans le cadre de cette méthode de vaccination.

L'herpèsvirus canin (en anglais Canine Herpesvirus ou CHV) a été décrit pour la première fois en 1965 (L. E. Carmichael, Am. J. Vet. Res., 1965, **26**, 803-814). L'infection par l'herpèsvirus canin a ensuite été identifiée dans de nombreux pays (U.S.A., France, Royaume-Uni, Suisse, Italie, Japon, Australie, Nouvelle-Zélande...). Le CHV est responsable de problèmes de reproduction dans les élevages canins et tout particulièrement de mortalité chez les chiots nouveau-nés qui peut occasionner des pertes importantes dans certaines collectivités. Il est également responsable d'avortements et de mortinatalité. L'infection par le CHV est par ailleurs suspectée de diminuer la fertilité des chiennes. La transmission du CHV se fait par voie vénérienne, par voie oronasale ou par voie trans-placentaire.

Le CHV appartient à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. A ce jour, un seul type de CHV a été identifié. Il s'agit d'un virus enveloppé contenant une molécule d'ADN double brin. L'enveloppe présente plusieurs glycoprotéines d'origine virale. Les glycoprotéines gB, gC et gD sont responsables de l'induction d'anticorps neutralisants chez la souris.

Le CHV est antigéniquement proche de l'herpèsvirus félin (J.A. Limcumpao *et al.*, Arch. Virol., 1990, **111**, 165-176) mais sans neutralisation croisée significative (X. Xuan *et al.*, Arch. Virol., 1992, **122**, 359-365).

Le CHV est fortement dépendant de son hôte et ne se multiplie que sur des cellules d'origine canine (Pierson *et al.*, recueil de Médecine Vétérinaire, mars/avril 1998, **174** n°3/4, 87-94).

30 Les chiots nouveau-nés sont très sensibles à l'infection par le CHV lors des 3 premières semaines de vie. La contamination intervient lors de la

naissance ou dans les premiers jours de vie. La vaccination des chiots n'est en conséquence pas possible. Les seuls moyens de protection disponibles sont les mesures sanitaires comme le réchauffement des chiots avec une lampe à infrarouges et la sérothérapie. Le CHV est cependant peu immunogène et il est 5 difficile de préparer un bon sérum (L. E. Carmichael, J. Am. Vet. Med. Assoc., 1970, **156**, 1714-1721).

Dans les conditions naturelles, le chiot peut être protégé par les anticorps neutralisant le CHV présents dans le colostrum des chiennes séropositives : en l'absence de ces anticorps, le chiot est très sensible à l'infection par le CHV (D. 10 L. Huxsoll et I. E. Hemelt, J. Am. Vet. Med. Assoc., 1970, **156**, 1706-1713). Les animaux à risque sont les chiots nés de chiennes non infectées en contact d'animaux excréteurs, et les chiots nés de chiennes infectées latentes mais séronégatives ou faiblement séropositives. Les anticorps neutralisants le CHV persistent peu de temps, et un animal peut être infecté et séronégatif.

Le CHV provoque chez les chiots de moins de 3 semaines d'âge une 15 herpèsvirose néonatale souvent fatale. L'incubation est rapide et les chiots meurent en quelques jours le plus souvent sans autres symptômes qu'une hypothermie brutale et des troubles nerveux foudroyants, dans la grande majorité des cas avant l'âge de 5 jours. Dans les formes moins aiguës, l'hypothermie est suivie de symptômes tels qu'anorexie, dépression, bradycardie, 20 hypoglycémie, œdème sous-cutané, érythème et papules ventrales, selles molles gris-jaunâtre, douleurs abdominales, vomissements, plaintes incessantes, pédalage et mort en 24 à 72 heures en opisthotonus. L'examen nécropsique peut révéler une splénomégalie, un épanchement séreux dans les cavités 25 pleurales et péritonéale et des pétéchies viscérales (Pierson *et al.*, recueil de Médecine Vétérinaire, mars/avril 1998, **174** n°3/4, 87-94). Cet article rappelle qu'aucun vaccin contre l'herpèsvirose canine n'est actuellement commercialisé et suggère qu'il serait utile de pouvoir vacciner les reproducteurs infectés latents afin d'atténuer la ré-excrétion du virus sauvage.

30 Delisle F., dans son article (Rec. Med. Vet., 1982, **158**, 669-676), propose en revanche de vacciner les chiennes avant la gestation avec un vaccin inactivé

ou d'injecter un sérum aux chiots dès la naissance. Elle rappelle toutefois qu'aucun vaccin commercial n'est disponible. Voir aussi L. E. Carmichael, J. Am. Vet. Med. Assoc., 1970, **156**, 1714-1721. De son coté Appel A., dans son article (« Canine Herpesvirus » dans Virus Infections of Vertebrates, vol.1, MC Horzinek, Ed. MJ Appel Elsevier Science Publisher, 1987, 5-15), propose de vacciner des chiennes avant ou au tout début de la gestation avec un vaccin inactivé.

H. Poulet et P. Dubourget (Point Vét., 1993, **25**, 69-75) ont quant à eux suggéré en 1992 en termes généraux la vaccination de la mère avec un rappel en fin de gestation. Les auteurs rappellent aussi que des essais à partir de variants atténués ont été effectués (L. E. Carmichael *et al.*, Infection and Immunity, 1978, **20(1)**, 108-114 ; US-A-4,213,965 : vaccin vivant atténué, composé d'un variant thermosensible du virus CHV, dit « de petites plages »), mais que ces essais n'ont pas eu de résultats probants et n'ont pas donné lieu à la commercialisation de vaccins.

Anvik J. O., dans son article (Vet. Med., April 1991, **4**, 394-403), précise que la production d'anticorps neutralisants chez la mère et en conséquence la protection de la portée est imprédictible en raison de la faible immunogénicité du virus CHV.

Devant la difficulté de vaccination, Pierson *et al.* (recueil de Médecine Vétérinaire, mars/avril 1998, **174** n°3/4, 87-94) sont même allés jusqu'à proposer de vacciner la mère avec un vaccin inactivé contre le coryza du chat (FHV) ou d'administrer des anticorps anti-FHV aux chiots dès la naissance.

A ce jour aucune des hypothèses de vaccination n'a été confirmée, aucun vaccin n'est disponible dans le commerce et aucune publication ne fait état de résultats de vaccination convaincants annonciateurs de la commercialisation prochaine d'un tel vaccin.

En outre chez les femelles gestantes, l'infection au CHV peut conduire à une résorption embryonnaire, une momification fœtale, un avortement ou une mise bas prématurée, une mortinatalité, une mortalité néonatale. Des lésions placentaires peuvent apparaître.

Alors que des vaccins contre différents herpèsvirus existent chez d'autres espèces animales dont le chat, la vaccination efficace contre l'herpèsvirose canine n'a jamais pu être proposée.

5 La présente invention a pour objectif la mise au point d'une méthode de vaccination contre l'herpèsvirose canine permettant de protéger les chiots.

Un autre objectif de l'invention est l'élaboration de vaccins, efficaces et pharmaceutiquement acceptables, utilisables dans le cadre de cette méthode de vaccination.

10 La déposante a trouvé de façon surprenante qu'il est possible de vacciner les chiennes gestantes et les nouveaux-nés en administrant un vaccin pendant la période de gestation et en particulier le plus près possible de la mise bas de façon à avoir un taux d'anticorps anti-CHV élevé chez la femelle gestante au moment de la mise bas, ce taux assurant la protection du chiot à la naissance par transmission des anticorps maternels lors de l'allaitement. En outre ces 15 anticorps se maintiennent substantiellement chez le chiot pendant les premières semaines de sa vie, période où il est sensible à la maladie (3 à 4 semaines). Un titre en anticorps neutralisant chez la chienne égal ou supérieur à 0,9 log₁₀ est préféré et plus particulièrement un titre égal ou supérieur à 1,2 log₁₀. Les titres 20 indiqués sont calculés d'après la méthode décrite dans l'exemple 7. La vaccination chez la chienne amène d'autre part une réduction de la pression d'infection chez le chiot. La déposante a observé par ailleurs chez les chiennes vaccinées en milieu contaminé un poids des chiots supérieur à la naissance et une tendance à un taux de gestation plus élevé. Ces phénomènes peuvent 25 s'expliquer par une réduction ou une absence de lésions placentaires chez les chiennes vaccinées (A. Hashimoto et al., Am. J. Vet. Res., 1979, **40**(9), 1236-1240 ; A. Hashimoto et al., Am. J. Vet. Res., 1982, **43**(5), 844-850).

Les objectifs de l'invention déjà mentionnés, ainsi que d'autres, sont obtenus à l'aide d'une méthode de vaccination de la chienne gestante 30 comprenant l'administration d'un vaccin chez une femelle gestante le plus près possible de la mise bas, notamment pendant le dernier tiers de gestation (la

durée moyenne de gestation chez la chienne est d'environ 63 jours), notamment de 1 à 20 jours, en particulier de 1 à 15 jours, plus particulièrement de 5 à 15 à 5 jours, de préférence de 5 à 10 jours, avant la date présumée de mise bas, typiquement environ 10 jours avant, de façon à avoir un taux d'anticorps anti-CHV élevé chez la femelle gestante à la mise bas, induisant une protection des chiots par transfert des anticorps maternels lors de l'allaitement. Ces anticorps se maintiennent substantiellement pendant les premières semaines de vie du chiot, période où il est sensible à la maladie (3 à 4 semaines).

Par définition, un antigène, en quantité efficace dans le vaccin selon 10 l'invention, permet d'induire un titre élevé et protecteur d'anticorps dans les conditions du protocole chez la femelle gestante et le nouveau-né. Il peut s'agir d'antigène comprenant du virus CHV inactivé, du virus CHV atténué, une ou plusieurs sous-unités du virus CHV, un ou plusieurs antigènes exprimés par des recombinants.

15 De préférence, le vaccin est destiné à produire chez la femelle gestante, au moment de la mise bas, un taux d'anticorps anti-CHV (déterminé conformément à l'exemple 7) supérieur ou égal à environ 0,9 log₁₀, de préférence supérieur ou égal à environ 1,2 log₁₀.

Notamment dans le cas d'un animal n'ayant jamais été vacciné contre le 20 CHV, on procède de préférence à une (ou plusieurs) autre administration de vaccin anti-CHV avant l'administration décrite ci-dessus afin d'induire la réponse immunitaire chez l'animal. L'intervalle entre ces deux administrations doit être suffisant pour induire un effet rappel, ce qui en général demande au moins de 2 à 3 semaines. La primo-administration du vaccin se fait notamment dans une 25 période allant de l'oestrus à au moins deux à trois semaines avant l'administration décrite ci-dessus, en particulier dans la période allant de l'oestrus au premier tiers de gestation inclus, ce qui comprend une administration avant la saillie. De préférence cette administration est réalisée environ 7 à 10 jours après la saillie. Suivant une modalité préférée, on reproduit ce schéma de 30 vaccination pour chaque mise bas.

Si l'animal a déjà été vacciné contre le CHV, une seule administration proche de la mise bas peut suffire.

L'administration, ou l'une au moins des administrations supplémentaires peuvent aussi être réalisés avec un vaccin ayant une composition différente de celle intervenant au plus près de la mise bas, la différence pouvant toucher l'antigène et/ou la formulation du vaccin.

L'administration du vaccin peut se faire notamment par la voie parentérale, de préférence par la voie sous-cutanée ou intramusculaire.

Les volumes de dose peuvent être notamment compris entre 0,2 et 2 ml, de préférence de l'ordre de 1 ml.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'antigène CHV pour la préparation d'un vaccin contre l'herpèsvirose canine destiné à être administré selon le protocole décrit ci-dessus.

L'homme de l'art possède les compétences nécessaires pour définir précisément les doses de chaque vaccin en fonction du type de vaccin.

Lorsque plusieurs administrations sont pratiquées chez l'animal, les vaccins utilisés peuvent être de différents types, choisis notamment parmi ceux précédemment cités.

L'invention a aussi pour objet des vaccins inactivés ou des vaccins de sous-unités, utilisables notamment dans le cadre de cette méthode de vaccination.

L'utilisation de sous-unités CHV n'a été décrite que chez la souris (J. A. Limcumpao *et al.*, J. Vet. Med. Sci., 1991, 53(3), 423-432). Les données obtenues chez la souris ne peuvent cependant pas être extrapolées à l'espèce canine comme le précise ce document. Bien que les titres en anticorps obtenus avec les glycoprotéines gp145/112, gp80 et gp47 purifiées induisent une réponse en anticorps détectable, il n'est pas toutefois possible de déterminer si ce titre en anticorps peut se traduire par une protection car la souris n'étant pas sensible au virus CHV il n'est pas possible de développer un modèle d'épreuve virulente chez cette espèce. Egalement aucune donnée n'est disponible concernant l'immunité cellulaire induite par CHV. Par ailleurs la relation entre le titre en

anticorps obtenu chez la souris et celui obtenu chez le chien n'est pas connue et ces titres peuvent se révéler différents. Ainsi il a été publié que des lapins immunisés avec la glycoprotéine gI d'herpès bovin de type 1 ont un titre neutralisant plus élevé que les lapins immunisés avec gIII, alors que chez le 5 bovin la glycoprotéine gIV induit le titre neutralisant le plus élevé et que la glycoprotéine gI est la moins immunogène. Ces données montrent la difficulté de transposition des résultats des animaux de laboratoire à l'espèce destinataire.

Conformément à l'invention, l'utilisation d'un vaccin inactivé ou de sous-unités permet la vaccination de la chienne pendant la phase de gestation sans 10 risque pour la chienne et sa progéniture. La vaccination avec rappel en fin de gestation est le moyen d'assurer un titre optimal en anticorps neutralisants à la naissance. Ce titre conditionne la protection obtenue par transfert des anticorps neutralisants de la chienne à ses chiots en début d'allaitement.

La culture et la propagation du virus CHV se fait de préférence sur des 15 cellules canines primaires ou de lignée, plus particulièrement sur cellules rénales canines de lignée de type MDCK (en anglais Madin-Darby Canine Kidney ou MDCK accessible auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro CCL-34) notamment avec une multiplicité d'infection (moi) de 0,1 à 0,001 doses infectantes 50 % en culture de cellules (DICC₅₀) par cellule, de 20 préférence 0,01 DICC₅₀/cellule. La récolte du virus CHV a lieu 3 à 4 jours plus tard. On peut obtenir un titre viral d'environ 10⁶ à 10⁸ DICC₅₀/ml et en général de 10^{6,5} à 10^{7,5} DICC₅₀/ml.

Pour obtenir un vaccin inactivé, le virus CHV est inactivé, notamment 25 après récolte et clarification, par un traitement chimique (e.g. formol ou formaldéhyde, β-propiolactone, éthylèneimine, éthylèneimine binaire (BEI)) et/ou thermique. De préférence, le virus selon l'invention est inactivé par action de l'éthylèneimine. Les particules virales peuvent être concentrées par des techniques classiques de concentration, notamment par ultrafiltration et/ou purifiées par des moyens de purification classiques, notamment les techniques 30 de gel-filtration, d'ultracentrifugation sur gradient de saccharose ou de précipitations sélectives en particulier en présence de polyéthylène glycol (PEG).

Le vaccin de sous-unités est de préférence un vaccin sous-unités d'extraction, c'est-à-dire qu'il est préparé à partir du virus entier ou d'une fraction importante de ce virus (par exemple après élimination de la capsid). En particulier, ce vaccin peut comprendre les différentes glycoprotéines d'enveloppe ou un mélange de glycoprotéines d'enveloppe. La préparation du vaccin de sous-unités est de préférence réalisée à partir d'une suspension virale inactivée, notamment inactivée comme décrit ci-dessus. De manière préférée, pour obtenir un vaccin de sous-unités, contenant principalement les glycoprotéines d'enveloppe, la suspension de particules virales, de préférence inactivées obtenue précédemment, est soumise à l'action d'un détergent approprié, notamment non ionique, de préférence un alcool éthoxylé ayant avantageusement un HLB compris entre 12 et 15. Les capsides virales sont ensuite éliminées notamment par ultracentrifugation. D'autres méthodes équivalentes, permettant d'éliminer les capsides et de recueillir les glycoprotéines d'enveloppe sont à la disposition de l'homme du métier.

Pour l'élaboration d'un vaccin inactivé ou d'un vaccin de sous-unité, l'antigène est repris dans un véhicule ou excipient acceptable au plan vétérinaire et de préférence additionné d'un adjuvant acceptable au plan vétérinaire. La quantité d'antigène équivaut notamment à un équivalent titre avant inactivation d'environ 10^5 à environ $10^{9.5}$ DICC₅₀ par dose, notamment d'environ 10^5 à environ 10^9 par dose. Plus particulièrement, pour un vaccin inactivé, le titre avant inactivation est compris entre environ 10^5 et environ 10^9 DICC₅₀ par dose, notamment entre environ 10^6 et environ 10^8 par dose. Plus particulièrement, pour un vaccin sous-unités, le titre avant inactivation est compris entre environ 10^6 et environ $10^{9.5}$, en particulier entre environ 10^7 et environ 10^9 , de préférence entre environ $10^{7.5}$ et environ $10^{8.5}$, par dose. De préférence, lorsqu'il s'agit d'un vaccin sous-unités, il présente un titre en glycoprotéine gB, mesuré en ELISA, d'environ 0,01 µg à environ 30 µg, en particulier d'environ 0,1 µg à environ 10 µg, et de préférence d'environ 0,3 µg à environ 3 µg, par dose.

Les vaccins selon l'invention sont conservés et stockés soit sous forme formulée à 5°C, soit sous forme lyophilisée, de préférence avec un stabilisateur,

notamment du SPGA (saccharose, phosphate, glutamate, albumine, EP-B1-0,008,255). Ces vaccins peuvent être repris ultérieurement en solvant (véhicule ou excipient et/ou adjuvant).

Pour adjuver les vaccins selon l'invention, on peut utiliser (1) de
5 l'hydroxyde d'alumine, (2) un polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique, un polymère d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, (3) une séquence immunostimulatrice (ISS), notamment une séquence oligodésoxyribonucléotidique ayant un ou plusieurs motifs CpG non méthylés (Klinman D. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, **93**, 2879-2883 ; WO-A1-
10 98/16247), ou (4) formuler la préparation immunogène ou vaccin sous forme d'une émulsion huile-dans-l'eau en particulier l'émulsion SPT décrite à la page 147 de « Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach » edited by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, et l'émulsion MF59 décrite à la page 183 du même ouvrage.

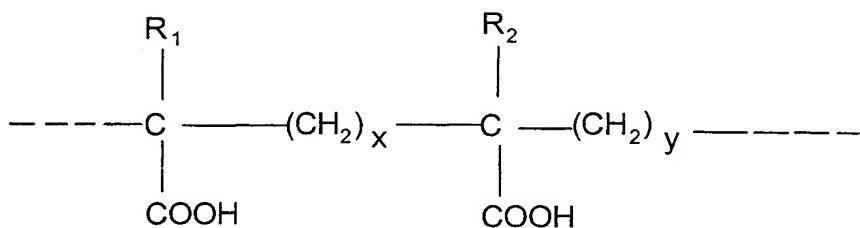
L'émulsion huile-dans-l'eau peut notamment être à base d'huile de paraffine liquide légère (type Pharmacopée européenne) ; d'huile isoprénoïde telle que le squalane, le squalène ; d'huile résultant de l'oligomérisation d'alcènes, en particulier d'isobutène ou de decène ; des esters d'acides ou d'alcools à groupement alkyle linéaire, plus particulièrement les huiles végétales, 15 l'oléate d'éthyle, le di(caprylate / caprate) de propylène glycol, le tri(caprylate / caprate) de glycérol, le dioléate de propylène glycol ; des esters d'acides ou d'alcools gras ramifiés, en particulier des esters de l'acide isostéarique. L'huile est utilisée en association avec des émulsifiants pour former l'émulsion. Les émulsifiants sont de préférence des tensio-actifs non ioniques en particulier les 20 esters de sorbitan, de mannide (e.g. oléate d'anhydromannitol), de glycérol, de polyglycérol, de propylène glycol et d'acide oléique, isostéarique, ricinoléique, hydroxystéarique, éventuellement éthoxylés, les blocs copolymères polyoxypropylène-polyoxyéthylène en particulier les Pluronic®, notamment 25 L121.

Les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique sont réticulés 30 notamment par des éthers polyalcényliques de sucres ou de polyalcools. Ces

composés sont connus sous le terme carbomère (Pharneuropa vol. 8, n° 2, juin 1996). L'homme de l'art peut aussi se référer à US-A-2,909,462 (incorporé par référence) décrivant de tels polymères acryliques réticulés par un composé polyhydroxylé ayant au moins 3 groupes hydroxyle, de préférence pas plus de 8,
 5 les atomes d'hydrogène d'au moins trois hydroxyles étant remplacés par des radicaux aliphatiques insaturés ayant au moins 2 atomes de carbone. Les radicaux préférés sont ceux contenant de 2 à 4 atomes de carbone, e.g. vinyls, allyles et autres groupes éthyléniquement insaturés. Les radicaux insaturés peuvent eux-mêmes contenir d'autres substituants, tel que méthyl. Les produits
 10 vendus sous la dénomination Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) sont particulièrement appropriés. Ils sont réticulés par un allyl saccharose ou par de l'allylpentaérythritol. Parmi eux, on peut citer les Carbopol® 974P, 934P et 971P.

Parmi les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, on préfère les EMA® (Monsanto) qui sont des copolymères d'anhydride maléique et d'éthylène, linéaires ou réticulés, par exemple réticulés par du divinyléther. On peut se référer à J. Fields *et al.*, Nature, 186, 778-780, 4 juin 1960 (incorporé par référence). Sur le plan de leur structure, les polymères d'acide acrylique ou méthacrylique et les EMA® sont formés de préférence de motifs de base de formule suivante :

20



dans laquelle :

- R_1 et R_2 , identiques ou différents, représentent H ou CH_3
- $x = 0$ ou 1 , de préférence $x = 1$
- 25 - $y = 1$ ou 2 , avec $x + y = 2$

Pour les EMA®, $x = 0$ et $y = 2$. Pour les carbomères, $x = y = 1$.

La concentration en polymère dans la composition vaccinale finale sera de 0,01 % à 1,5 % P/V, plus particulièrement de 0,05 à 1 % P/V, de préférence de 0,1 à 0,4 % P/V.

Une forme de vaccin particulièrement préférée comprend un vaccin inactivé ou de sous-unités formulé sous forme d'une émulsion huile dans l'eau comprenant de l'oléate d'anhydromannitol, de l'acide oléique éthoxylé et de l'huile de paraffine liquide légère. En particulier, une méthode d'immunisation des chiennes gestantes selon l'invention comprend l'administration d'un tel vaccin. Deux injections de préférence sous-cutanées sont réalisées, en particulier selon le schéma décrit plus haut, par exemple avec la première injection pendant le premier tiers de la gestation de préférence environ 10 jours après la date de la saillie et notamment la deuxième injection pendant le dernier tiers de préférence environ 10 jours avant la date présumée de la mise bas.

L'invention a aussi pour objet le procédé de préparation du vaccin inactivé ou de sous-unités décrit.

L'invention a aussi pour objet des vaccins multivalents comprenant la valence herpèsvirus canin inactivée ou de sous-unités, et au moins une valence pour au moins un autre pathogène canin, dans un véhicule ou excipient acceptable au plan vétérinaire et de préférence avec un adjuvant, notamment l'un de ceux décrits précédemment.

Lesdits pathogènes canins sont notamment choisis parmi le groupe comprenant le virus de la maladie de Carré, le parvovirus canin et l'adénovirus canin, mais d'autres valences peuvent aussi être associées.

Les vaccins CHV inactivés ou de sous-unités selon l'invention peuvent être administrés simultanément dans la même préparation ou successivement dans des préparations différentes avec la ou les autres valences canines qui peuvent être sous forme de vaccins vivants atténués, inactivés, sous-unitaires, recombinés ou polynucléotidiques.

L'invention a donc également pour objet un kit ou ensemble de vaccin multivalent comprenant, conditionnées séparément, une valence CHV selon l'invention dans un véhicule ou excipient acceptable au plan vétérinaire, et de

préférence avec un adjuvant, notamment ceux décrits précédemment, et au moins une valence d'au moins un autre pathogène canin. La valence CHV selon l'invention peut servir de solvant pour l'autre valence canine, notamment pour une valence atténuée, recombinée ou polynucléotidique se présentant sous forme lyophilisée.

5 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs.

Exemples :

10 **Exemple 1 : Souche virale**

La souche d'herpèsvirus canin utilisée est la souche F205 (L. E. Carmichael, Am. J. Vet. Res., 1965, **26**, 803-814), disponible auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro VR-647.

15 **Exemple 2 : Amplification de l'herpèsvirus canin**

Des cellules de lignée canine (Madin-Darby Canine Kidney ou MDCK) disponible auprès de l'ATCC sous le numéro CCL-34 sont mises en culture en flacons roulants de 2 litres (850 cm^2) avec du milieu Dulbecco modified Eagle's minimum essential medium (DMEM - Gibco BRL) supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal (Bayer Diagnostic) et de gentamicine à 50 mg/l à raison de 200 000 cellules par ml sous un volume de 350 ml. Les cellules sont cultivées à 20 +37°C en atmosphère contenant 5% de CO₂.

Après 3 ou 4 jours la couche cellulaire arrive à confluence. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu DMEM sans sérum mais toujours additionné de 50 mg/l de gentamicine et les cellules sont inoculées avec l'herpèsvirus canin (exemple 1) avec une multiplicité d'infection (moi) de 0,01 DCC₅₀/cellule. La culture virale est maintenue à 37°C.

30 Lorsque l'effet cytopathique (ECP) est complet (environ 96 heures après le début de la mise en culture), la suspension virale est récoltée et congelée à -70°C. Plusieurs passages d'amplification cellulaire peuvent être réalisés préalablement à l'inoculation virale en fonction de la quantité de virus souhaitée.

Les passages cellulaires et la culture virale peuvent également être réalisés en cultivant les cellules sur microporeux en biogénérateur.

Le virus est conservé jusqu'aux étapes suivantes à 5°C.

Le titre du virus CHV à la récolte est $10^{7,2}$ DICC₅₀ par ml.

5

Exemple 3 : Titrage du virus CHV

Le titrage du virus CHV est réalisé en microplaques de 96 cupules en milieu F15 additionné de 5% de sérum de veau fœtal et de gentamicine 50 mg/l. Les dilutions avec une raison d'ordre 3 de la suspension virale sont mélangées à 10 une suspension de cellules MDCK dans la microplaque à raison de 0,10 ml de dilution de virus pour 100 000 cellules sous 0,15 ml par cupule. Après de 4 à 5 jours d'incubation à 37°C avec 5% de CO₂, les cupules présentant un ECP généralisé sont comptabilisées et le titre est calculé en doses infectieuses pour culture de cellules 50 % (DICC₅₀) par la méthode de Kärber.

15

Exemple 4 : Inactivation du virus

Le virus CHV amplifié comme cela est décrit dans l'exemple 2 est inactivé par l'éthylèneimine à la concentration d'environ 12 mM à 37°C pendant 6 heures.

L'éthylèneimine est préparée extemporanément en dissolvant 28,0 g de soude en pastille dans 200 ml d'eau distillée et en ajoutant 68,1 g de bromoéthylamine (BEA) correspondant à une solution d'éthylèneimine 1,2 M (H. Bahnemann, Arch. Virol., 1975, 47, 47-56). La suspension virale inactivée est concentrée 100 fois sur cassette d'ultrafiltration type Ultrasette avec un seuil de coupure de 300 kDa (Filtron). Le virus inactivé concentré peut être congelé et 25 stocké à -40°C.

Exemple 5 : Extraction des glycoprotéines virales

Le virus inactivé (exemple 4) est clarifié par centrifugation à 2500 g pendant 30 min. Le liquide surnageant est ensuite concentré 50 fois sur cassette 30 d'ultrafiltration type Ultrasette avec un seuil de coupure de 300 kDa (Filtron). Le concentrat est additionné de polyéthylène glycol 8000 (PEG 8000) à 8% P/V et

de chlorure de sodium 4% P/V. Après un contact de 16 heures à 4°C, le virus précipité est sédimen^{té} par centrifugation à 2500 g pendant 60 min, puis repris en tampon phosphate (PBS : NaCl 8 g/l ; KCl 0,2 g/l ; KH₂PO₄ 0,2 g/l ; Na₂HPO₄, 2 H₂O 1,44 g/l). Puis repris en tampon phosphate isotonique à raison d'un 5 centième du volume initial. Le concentré viral subit ensuite une ultracentrifugation zonale sur coussin de saccharose (35 % et 60 % P/P en PBS, pendant 60 min, à 200 000 g) avec un rotor zonal ou un rotor à angle fixe Ti45. Le virus est récolté à l'interface et est dilué environ au quart en PBS. Puis ajouter 10 un alcool cétylique 10 OE (alcool éthoxylé d'HLB 13) à la concentration de 1,5% P/V, incuber une heure à 37°C. Les capsides sont ensuite sédimen^{tées} par ultracentrifugation pendant une heure à 230 000 g avec un rotor Ti45. Le surnageant contenant les glycoprotéines est recueilli. La solution de 15 glycoprotéines peut éventuellement être concentrée par ultrafiltration.

La solution de glycoprotéines purifiées est conservées à -40°C jusqu'à 15 formulation du vaccin.

Exemple 6 : Formulation des vaccins

L'antigène inactivé concentré (exemple 4) ou la solution de sous-unités (exemple 5), après décongélation, est dilué(e) en tampon PBS en fonction de la 20 quantité requise d'antigènes par dose.

Le vaccin adjuvé est préparé de la manière suivante : 167 ml de phase aqueuse constituée de 8 ml d'antigène viral inactivé ou sous-unité et de 159 ml de PBS sont émulsionnés dans 83 ml de phase huileuse contenant 7% p/v d'oléate d'anhydromannitol, 8% p/v d'acide oléique éthoxylé à 11 OE (oxyde 25 d'éthylène) et 85% v/v d'huile de paraffine liquide légère (type Pharmacopée européenne) à l'aide d'un émulseur à turbine Silverson à 32°C pendant 2 minutes. Le vaccin formulé sous forme d'émulsion huile-dans-eau est ensuite stocké à 5°C.

Une méthode alternative pour préparer le vaccin consiste à mettre en 30 émulsion par trois passages à travers un homogénéiseur haute pression modèle Y110 (Microfluidics Corp.) à une pression de 600 bars et une température

comprise entre 30 et 40°C le mélange 5% p/v squalane, 2,5% p/v Pluronic® L121, 0,2% p/v d'un ester d'acide oléique et d'un anhydrosorbitol éthoxylé à 20 OE, 92,3% v/v de l'antigène viral dilué au 1/30^{ème} en tampon PBS après décongélation. Le vaccin formulé sous forme d'émulsion huile-dans-eau est
5 ensuite stocké à 5°C.

Une autre méthode alternative consiste à réaliser une solution à 0,4% p/v de Carbopol® 974P en eau physiologique (NaCl 9 g/l). Le pH est ajusté à 7,3-7,4 avec de la soude. Cette solution de Carbopol est ensuite mélangée à partie égale à l'antigène viral dilué au 1/16^{ème} après décongélation. Le vaccin formulé
10 sous d'une suspension est ensuite conservé à 5°C.

0,5 ml d'une solution de sous-unités (exemple 5), après décongélation, diluée en tampon PBS au 1/15^{ème} est ajoutée à 0,5 ml de substrat de lyophilisation SPGA (saccharose, phosphate, glutamate, albumine, EP-B1-0,008,255). Ce mélange est réparti en flacon et lyophilisé puis conservé à 5°C.
15 Le diluant est constitué par les adjuvants précédemment décrit en incorporant uniquement du tampon PBS dans la phase aqueuse.

Exemple 7: Titrage des anticorps neutralisants anti-CHV.

Les sérums à titrer sont testés pour leur aptitude à neutraliser le virus CHV. Les sérums prélevés sur les animaux sont dilués en cascade au tiers avec du milieu DMEM additionné de 5% de sérum de veau fœtal dans des plaques à 96 trous pour culture cellulaire. A 0,05 ml du sérum dilué sont ajoutés 0,05 ml de milieu de culture contenant approximativement 200 DICC₅₀/ml de CHV. Ce mélange est incubé pendant 2 heures à 37°C en étuve en atmosphère contenant
25 5% CO₂.

0,15 ml d'une suspension de cellules MDCK contenant environ 100 000 cellules par ml est ensuite ajoutée à chaque mélange. L'effet cytopathique (ECP) est observé par microscopie à contraste de phase après 5 jours de culture à 37°C en atmosphère contenant 5% CO₂. Les titres neutralisants de chaque sérum sont
30 calculés d'après la méthode de Kärber. Les titres sont donnés sous la forme de la dilution la plus importante inhibant l'effet cytopathique pour 50 % des cupules.

Les titres sont exprimés en log₁₀ VN50. Chaque sérum est titré au moins deux fois, de préférence quatre fois.

Exemple 8 : Efficacité

- 5 12 chiennes Beagle EOPS non vaccinées ont été incluses dans l'étude et réparties par randomisation en 2 groupes de 6 animaux. Les chiennes du premier groupe sont vaccinées avec le vaccin CHV de sous-unités adjuvé avec l'émulsion huile-dans-eau à base d'huile de paraffine (exemple 6), les chiennes de l'autre groupe avec un vaccin placebo.
- 10 Les chiennes ont été vaccinées à 2 reprises par voie sous-cutanée environ 10 jours après saillie, puis environ 10 jours avant la date présumée de la mise-bas. Le lyophilisat repris par 1 ml de solvant huileux est administré aux chiennes. Ceci correspond à un équivalent titre de 10^{7,7} DICC₅₀ avant inactivation.
- 15 Après la mise-bas, les chiots nouveau-nés sont éprouvés à l'âge de 3 jours avec 50 à 100 DICC₅₀ d'une souche virulente de CHV, par exemple F205 isolée par L. E. Carmichael (Am. J. Vet. Res., 1965, **26**, 803-814) ou CHV 270 (H. Hill, Am. J. Vet. Res., 1974, **35**, 669-673) ou CHV C4012SE, par voie oronasale (0,5 ml par voie orale et 0,25 ml dans chaque narine). Les chiots sont ensuite observés pendant 3 semaines. Les signes cliniques et la mortalité sont relevés. Après leur décès, tous les chiots sont autopsiés. Les lésions macroscopiques caractéristiques de l'herpèsvirose canine sont recherchées au niveau des reins, rate, foie, poumons, tractus digestif, cœur et ganglions mésentériques, et des prélèvements sont réalisés pour un isolement de CHV sur 20 cellules MDCK. Le diagnostic d'herpèsvirose canine est basé sur la mort du chiot, la présence de lésions macroscopiques caractéristiques et confirmé par un isolement viral.
- 25 Toutes les chiennes vaccinées ont séroconverti et ont un titre élevé en anticorps neutralisants au moment de la mise bas. Ces titres sont mesurés par la méthode décrite dans l'exemple 6 et sont exprimés en log₁₀ VN50.

Titres SN moyens anti-CHV chez les chiennes	Jour de la primo-vaccination	Jour du rappel	Jour de l'épreuve	3 semaines après épreuve
groupe contrôle	< 0,24 +/- 0,00	< 0,24 +/- 0,00	< 0,29 +/- 0,13	< 1,36 +/- 0,65
groupe vacciné	< 0,35 +/- 0,17	< 1,04 +/- 0,34	1,76 +/- 0,20	2,11 +/- 0,51

Parmi les chiots nés des mères vaccinées, aucun n'est mort d'herpesvirose canine (0/27). Aucun virus CHV n'a été ré-isolé de ces chiots.

5 Parmi les chiots nés de mère non vaccinées (groupe placebo), un taux de mortalité due au CHV de 62% (18/29) a été observé. De l'isolement viral est également observé chez 55% de ces chiots (16/29) : les prélèvements provenant de 2 chiots ont été contaminés par des bactéries et n'ont pu être testés pour l'isolement viral de CHV.

La différence du taux de mortalité entre les 2 groupes est hautement 10 significative (test exact de Fisher ; p<0.0001).

15 Des chiennes Yorkshire réparties par randomisation en 2 groupes sont maintenues en milieu infecté. Les 14 chiennes du premier groupe sont vaccinées avec le vaccin CHV de sous-unités adjuvé avec une émulsion huile-dans-eau à base d'huile de paraffine (exemple 6), les 6 chiennes de l'autre groupe avec un vaccin placebo. Le protocole de vaccination est identique à ce qui est décrit plus haut.

A leur naissance, le poids des chiots est mesuré.

Le poids des 28 chiots nés d'une mère vaccinée est sensiblement plus 20 élevé (poids moyen de 141,8 g) que celui des 14 chiots nés d'une mère non vacciné (poids moyen de 85,0 g), soit un gain pondéral de 166,8%. La différence est significative (Kruskal-Wallis, p<0,01).

Les résultats montrent en milieu contaminé une tendance à augmenter le taux de gestation chez les chiennes vaccinées.

Le taux de gestation est de 82% chez les chiennes vaccinées (50/61) et de 68% chez les chiennes non vaccinées (groupe placebo) (19/28) (test exact de Fisher, p=0,11).

5 Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

Revendications

1. Utilisation d'antigène de CHV pour la préparation d'un vaccin permettant de protéger les chiots contre l'herpèsvirose canine, destiné à être administré chez la chienne gestante de 1 à 20 jours avant la date présumée de mise bas, notamment de 1 à 15 jours, plus particulièrement de 5 à 15 jours, plus particulièrement encore de 5 à 10 jours, de préférence environ 10 jours avant cette date, et produisant un taux d'anticorps anti-CHV élevé chez la chienne gestante au moment de la mise bas, induisant une protection chez les chiots par transfert d'anticorps lors de l'allaitement.
5
2. Utilisation d'antigène de CHV pour la préparation d'un vaccin permettant de vacciner les chiots contre l'herpèsvirose canine, destiné à être administré chez la chienne gestante le plus près possible de la mise bas, notamment pendant le dernier tiers de la gestation, et produisant chez la femelle gestante, au moment de la mise bas, un taux d'anticorps anti-CHV supérieur ou égal à $0,9 \log_{10}$, de préférence supérieur ou égal à $1,2 \log_{10}$, induisant une protection chez les chiots par transfert d'anticorps lors de l'allaitement.
15
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le vaccin est destiné à produire chez la femelle gestante, au moment de la mise bas, un taux d'anticorps anti-CHV supérieur ou égal à $0,9 \log_{10}$, de préférence supérieur ou égal à $1,2 \log_{10}$.
20
4. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le vaccin est destiné à être administré de 1 à 20 jours avant la date présumée de mise bas, notamment de 1 à 15 jours, plus particulièrement de 5 à 15 jours, plus particulièrement encore de 5 à 10 jours, de préférence environ 10 jours avant cette date.
25
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, le vaccin étant destiné à être administré à une femelle préalablement vaccinée avec un vaccin contre CHV.
- 30 6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que les vaccinations sont séparées par un intervalle d'au moins deux à trois semaines et

notamment l'administration du premier vaccin a lieu dans la période allant de l'oestrus à 2 à 3 semaines avant la première administration, en particulier dans la période allant de l'oestrus et comprenant le premier tiers de la gestation, de préférence 7 à 10 jours après la saillie.

- 5 7. Utilisation selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce les vaccins sont identiques ou différents.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le vaccin comprend un antigène choisi dans le groupe constitué de virus CHV inactivé, virus CHV atténué, sous-unité du virus CHV, antigène exprimé par un recombinant.
- 10 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le vaccin comporte des sous-unités du virus CHV, et de préférence il s'agit d'un vaccin sous-unités d'extraction.
- 15 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le vaccin comprend des glycoprotéines d'enveloppe du virus CHV.
11. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le vaccin comprend du virus CHV inactivé.
12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le vaccin comporte un véhicule ou excipient et un adjuvant acceptables au plan vétérinaire.
- 20 13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce que le vaccin comprend une quantité d'antigène correspondant à un équivalent en titre avant inactivation d'environ 10^5 à environ $10^{9,5}$ DICC₅₀ par dose.
- 25 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisée en ce que le vaccin est formulé sous forme d'une émulsion huile-dans-eau ou sous forme de suspension avec du carbomère.
15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que le vaccin est formulé sous forme d'une émulsion comprenant soit de l'oléate d'anhydromannitol, de l'acide oléique éthoxylé et de l'huile de paraffine
- 30

liquide légère, soit du Pluronic®, de l'ester de sorbitan et d'acide oléique éthoxylé et du squalane, ou sous forme d'une suspension de Carbopol®.

16. Vaccin anti-CHV comprenant les sous-unités d'extraction du virus CHV, éventuellement après élimination des capsides virales, dans un véhicule ou excipient, et de préférence un adjuvant, acceptables au plan vétérinaire.
5
17. Vaccin anti-CHV comprenant du virus CHV inactivé ou les sous-unités d'extraction du virus CHV, éventuellement après élimination des capsides virales, sous forme lyophilisée, et pouvant être repris avant utilisation par un adjuvant.
- 10 18. Vaccin selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que l'adjuvant est de l'hydroxyde d'alumine.
19. Vaccin selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que l'adjuvant est un polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique ou un polymère d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, de préférence du Carbopol®.
- 15 20. Vaccin selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce qu'il est formulé sous forme d'une émulsion huile-dans-l'eau.
21. Vaccin selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'émulsion huile dans l'eau comprend soit de l'oléate d'anhydromannitol, de l'acide oléique éthoxylé et de l'huile de paraffine liquide légère, soit du Pluronic®, de l'ester de sorbitan et d'acide oléique éthoxylé et du squalane.
20
22. Vaccin anti-CHV comportant du virus CHV inactivé, à raison d'une quantité d'antigène qui équivaut à un équivalent titre avant inactivation de 10^5 à $10^{9,5}$ DICC₅₀, notamment de 10^5 à 10^9 DICC₅₀, de préférence de 10^6 et 10^8 par dose, dans un véhicule ou excipient acceptable au plan vétérinaire et de préférence avec un adjuvant.
25
23. Vaccin anti-CHV comportant du virus CHV inactivé, notamment selon la revendication 22, caractérisé en ce que soit il comporte un adjuvant choisi parmi l'hydroxyde d'alumine, un polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique ou un polymère d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, de préférence du Carbopol®, une séquence immunostimulatrice, soit il est formulé sous forme d'une émulsion huile-dans-l'eau.
30

24. Vaccin selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'émulsion huile dans l'eau comprend soit de l'oléate d'anhydromannitol, de l'acide oléique éthoxylé et de l'huile de paraffine liquide légère, soit du Pluronic®, de l'ester de sorbitan et d'acide oléique éthoxylé et du squalane.
- 5 25. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 16 à 24, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'un virus CHV inactivé par un traitement chimique et/ou thermique.
- 10 26. Vaccin selon la revendication 25, caractérisé en ce que le virus CHV est inactivé par le formol, la β-propiolactone, l'éthylèneimine, ou l'éthylèneimine binaire.
27. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 16 à 21, caractérisé en ce que le vaccin est un vaccin de sous-unités susceptible d'être obtenu en soumettant une suspension de particules virales CHV, de préférence inactivées, à l'action d'un détergent approprié.
- 15 28. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 16 à 21 et 23 à 27, caractérisé en ce qu'il comprend des sous-unités du virus CHV en quantité qui équivaut à un équivalent titre avant inactivation de 10^6 à $10^{9,5}$ DICC₅₀, en particulier de 10^7 à 10^9 DICC₅₀, de préférence de $10^{7,5}$ à $10^{8,5}$, par dose.
29. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 16 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un antigène d'au moins un autre pathogène canin.
- 20 30. Vaccin selon la revendication 29, caractérisé en ce que le pathogène canin est choisi dans le groupe consistant en virus de la maladie de Carré, parvovirus canin, adénovirus canin et leurs associations.
- 25 31. Vaccin selon l'une des revendications 16 à 21 et 25 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend un titre en glycoprotéine gB, mesuré en ELISA, d'environ 0,01 µg à environ 30 µg, en particulier d'environ 0,1 µg à environ 10 µg, et de préférence d'environ 0,3 µg à environ 3 µg, par dose.
32. Ensemble de vaccin multivalent comprenant, conditionnés séparément, un vaccin CHV selon l'une quelconque des revendications 16 à 28 et 31 et un vaccin contre un autre pathogène canin, notamment choisi dans le groupe

consistant virus de la maladie de Carré, parvovirus canin, adénovirus canin et leurs associations.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 juillet 2001 (26.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/52887 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 39/245, 39/39, 39/295, A61P 31/22
// (A61K 39/295, 39:245, 39:23) (A61K 39/295, 39:245,
39:235) (A61K 39/295, 39:245, 39:175)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00189
- (22) Date de dépôt international :
19 janvier 2001 (19.01.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
00/00797 21 janvier 2000 (21.01.2000) FR
- (71) Déposant : **MERIAL** [FR/FR]; 17, rue Bourgelat,
F-69002 Lyon (FR).
- (72) Inventeur: **POULET, Hervé**; 3, place des Quatre Vierges,
F-69110 Sainte Foy les Lyon (FR).
- (74) Mandataire : **JACOBSON, Claude**; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- (88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 31 janvier 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: VACCINATION AGAINST CANINE HERPESVIRUS INFECTION AND VACCINES

(54) Titre : VACCINATION CONTRE L'HERPESVIROSE CANINE ET VACCINS

WO 01/52887 A3

(57) Abstract: The invention concerns the use of a CHV antigen for preparing a vaccine against canine herpesvirus infection, to be administered to the pregnant bitch as close as possible to birth, preferably during the last third of pregnancy, and producing a high anti-CHV antibody rate in the pregnant bitch at the time of birth, inducing protection in the pups by antibody transfer during suckling. The invention also concerns an inactivated anti-CHV or subunit vaccine, useful for vaccinating pregnant females to protect pups by antibody transfer.

(57) Abrégé : Utilisation d'antigène de CHV pour la préparation d'un vaccin contre l'herpèsvirose canine, destiné à être administré chez la chienne gestante le plus près possible de la mise bas, de préférence pendant le dernier tiers de la gestation, et produisant un taux d'anticorps anti-CHV élevé chez la chienne gestante au moment de la mise bas, induisant une protection chez les chiots par transfert d'anticorps lors de l'allaitement. Vaccin anti-CHV inactivé ou de sous-unités, utilisable pour la vaccination des femelles gestantes pour protéger les chiots par transfert d'anticorps.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat.	Application No
PCT/FR 01/00189	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/245 A61K39/39 A61K39/295 A61P31/22
 //((A61K39/295, 39:245, 39:23), (A61K39/295, 39:245, 39:235),
 (A61K39/295, 39:245, 39:175))

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 44633 A (MINKE JULES MAARTEN ;MERIAL SA (FR); AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRA) 10 September 1999 (1999-09-10) page 2, line 25 -page 7, line 10 ---	1-3, 8-21, 27-32
Y	ENGELS M ET COLL.: "Die Seroepizootologie des caninen Herpesvirusinfektion in der Schweiz und präliminäre Versuche mit einer Vakzine" ZENTRALBLATT FÜR VETERINÄRMEDIZIN REIHE B, vol. 27, no. 4, 1980, pages 257-267, XP000952687 page 261 -page 265 ---	1-8, 11-13
Y	---	1-32 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 July 2001

Date of mailing of the international search report

11/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat.	Application No
PCT/FR	01/00189

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 804 197 A (FRANK REXANN S ET AL) 8 September 1998 (1998-09-08) column 6, line 64 -column 7, line 30 column 24, line 55 - line 65 column 32, line 39 -column 33, line 58 -----	1-3, 8-10,12, 16-18
Y		1-32
A	WO 99 51269 A (MINKE JULES MAARTEN ;MÉRIAL SAS (FR); AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRA) 14 October 1999 (1999-10-14) -----	
A	PIERSON P ET COLL.: "L'herpès virose en élevage canin : aspects cliniques et diagnostic" RECUEIL DE MEDECINE VETERINAIRE, vol. 174, no. 3-4, March 1998 (1998-03), pages 87-94, XP000952697 cited in the application -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/FR 01/00189

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9944633	A 10-09-1999	FR 2775601 A			10-09-1999
		AU 3257199 A			20-09-1999
		BR 9908496 A			05-12-2000
		CN 1291899 T			18-04-2001
		EP 1058558 A			13-12-2000
US 5804197	A 08-09-1998	US 5753235 A			19-05-1998
		US 6159478 A			12-12-2000
		AU 728676 B			18-01-2001
		AU 2327897 A			02-09-1997
		CA 2243662 A			21-08-1997
		EP 0910406 A			28-04-1999
		JP 2000505297 T			09-05-2000
		WO 9729772 A			21-08-1997
WO 9951269	A 14-10-1999	FR 2776928 A			08-10-1999
		AU 2844899 A			25-10-1999
		BR 9909342 A			12-12-2000
		EP 1066055 A			10-01-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/00189

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 A61K39/245 A61K39/39 A61K39/295 A61P31/22
 // (A61K39/295, 39:245, 39:23), (A61K39/295, 39:245, 39:235),
 (A61K39/295, 39:245, 39:175)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 44633 A (MINKE JULES MAARTEN ; MERAL SA (FR); AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRA) 10 septembre 1999 (1999-09-10) page 2, ligne 25 -page 7, ligne 10 ---	1-3, 8-21, 27-32 1-32
Y	ENGELS M ET COLL.: "Die Seroepizootologie des caninen Herpesvirusinfektion in der Schweiz und präliminäre Versuche mit einer Vakzine" ZENTRALBLATT FÜR VETERINÄRMEDIZIN REIHE B, vol. 27, no. 4, 1980, pages 257-267, XP000952687 page 261 -page 265 ----	1-8, 11-13 1-32
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juillet 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/07/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/00189

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 804 197 A (FRANK REXANN S ET AL) 8 septembre 1998 (1998-09-08) colonne 6, ligne 64 -colonne 7, ligne 30 colonne 24, ligne 55 - ligne 65 colonne 32, ligne 39 -colonne 33, ligne 58 ---	1-3, 8-10, 12, 16-18
Y		1-32
A	WO 99 51269 A (MINKE JULES MAARTEN ;MERIAL SAS (FR); AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRA) 14 octobre 1999 (1999-10-14) ---	
A	PIERSON P ET COLL.: "L'herpèsvirose en élevage canin : aspects cliniques et diagnostic" RECUEIL DE MEDECINE VETERINAIRE, vol. 174, no. 3-4, mars 1998 (1998-03), pages 87-94, XP000952697 cité dans la demande -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 01/00189

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9944633 A	10-09-1999	FR	2775601 A		10-09-1999
		AU	3257199 A		20-09-1999
		BR	9908496 A		05-12-2000
		CN	1291899 T		18-04-2001
		EP	1058558 A		13-12-2000

US 5804197 A	08-09-1998	US	5753235 A		19-05-1998
		US	6159478 A		12-12-2000
		AU	728676 B		18-01-2001
		AU	2327897 A		02-09-1997
		CA	2243662 A		21-08-1997
		EP	0910406 A		28-04-1999
		JP	2000505297 T		09-05-2000
		WO	9729772 A		21-08-1997

WO 9951269 A	14-10-1999	FR	2776928 A		08-10-1999
		AU	2844899 A		25-10-1999
		BR	9909342 A		12-12-2000
		EP	1066055 A		10-01-2001
